

Über synthetische Ketoside der N-Glykolyl-D-neuraminsäure

Von

P. Meindl und **H. Tuppy**

Aus dem chemischen Laboratorium der Arzneimittelforschung Ges. m. b. H.*
und dem Institut für Biochemie der Universität, Wien

(Eingegangen am 28. Januar 1966)

Ketoside der N-Glykolyl-D-neuraminsäure wurden durch Umsetzung von 2-Chlor-2-desoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-(O-acetyl-glykolyl)-D-neuraminsäure mit verschiedenen Alkoholen und nachfolgende Entfernung der O-Acetylgruppen synthetisiert. Zu ihrer Charakterisierung eigneten sich die gut kristallisierenden Pentaacetyl-Derivate. Es wird ihnen eine α -glykosidische Konfiguration zugeschrieben, da sie — gleich den auf analoge Art dargestellten α -Ketosiden der N-Acetyl-D-neuraminsäure — von *Vibrio cholerae*-Neuraminidase gespalten werden.

Ketosides of N-glycolyl-D-neuraminic acid have been synthesized by the reaction of 2-chloro-2-desoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-(O-acetyl-glycolyl)-D-neuraminic acid with various alcohols, and subsequent removal of the O-acetyl groups. They can readily be characterized by their well crystallizing pentaacetyl derivatives. They are considered to be α -glycosides because they are cleaved, like the similarly prepared α -ketosides of N-acetyl-D-neuraminic acid, by the neuraminidase of *Vibrio cholerae*.

Wir haben kürzlich über die Synthese einer Reihe von N-Acetyl-D-neuraminsäure-Ketosiden, aus denen der glykosidisch gebundene Alkohol sowohl durch *Vibrio cholerae*-Neuraminidase als auch durch Influenza-A-Virus abgespalten werden kann, berichtet¹. Bestimmungen der optischen Drehung haben ergeben, daß die durch Neuraminidase spaltbaren Ketoside eine kleinere Lävrotation zeigen als ihre nicht spaltbaren Anomeren, deren Synthese wir ebenfalls vor kurzem beschrieben haben²; unter der

* Arzneimittelforschung Ges. m. b. H., A-1120 Wien, Laskegasse 5—8 (Österreich).

¹ P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **96**, 802 (1965).

² P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **96**, 816 (1965).

Voraussetzung, daß die Regel von *Hudson*³ für Glykoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure gültig ist, muß man die durch Neuraminidase spaltbaren Ketoside als α -, ihre Anomeren als β -Ketoside bezeichnen.

Wenn das Glykosidierungsverfahren von *Koenigs* und *Knorr*⁴, mit dessen Hilfe aus N-Acetyl-D-neuraminsäure deren α -Ketoside dargestellt worden sind, auf N-Glykolyl-D-neuraminsäure angewendet wird, erhält man in guter Ausbeute Ketoside, die durch *Vibrio cholerae*-Neuraminidase gespalten und demnach als α -Ketoside der N-Glykolyl-D-neuraminsäure betrachtet werden.

Die N-Glykolyl-D-neuraminsäure-Präparate, die für die Glykosidierungsversuche eingesetzt wurden, waren aus Schweine-Submaxillarmucin gewonnen worden und enthielten neben 80—85% N-Glykolylnoch 15—20% N-Acetyl-D-neuraminsäure. Sie wurden zunächst mittels Acetanhydrid und Pyridin acetyliert, wobei ein nicht kristallisierendes Hexa-O-acetyl-Derivat entstand. Dieses konnte, in Eisessig—Essigsäureanhydrid gelöst, mit trockenem Salzsäuregas zu einer Acetochlor-N-glykolyl-neuraminsäure umgesetzt werden. Die Chlorverbindung ließ sich infolge ihrer Zersetzlichkeit nicht analysenrein isolieren. Aus der Acetochlor-Verbindung wurde durch Reaktion mit verschiedenen wasserfreien Alkoholen, die, in großem Überschuß zugesetzt, zugleich als Lösungsmittel dienten, in Gegenwart von Silbercarbonat eine Reihe von gut kristallisierenden O-acetylierten α -Ketosiden dargestellt (Tab. 1). Der Glykolsäuregehalt der acetylierten Ketoside, der nach *Klenk* und *Uhlenbruck*⁵ bestimmt wurde, betrug 87—90% der Theorie; demnach waren die Substanzen noch mit etwas mehr als 10% der entsprechenden N-Acetyl-D-neuraminsäure-Derivate verunreinigt. Durch milde alkalische Verseifung erhielten wir die meist nicht kristallisierenden, jedoch chromatographisch einheitlichen Ketoside der N-Glykolyl-D-neuraminsäure (Tab. 2).

Die α -Ketoside der N-Glykolyl-D-neuraminsäure verhalten sich wie die entsprechenden Derivate der N-Acetyl-D-neuraminsäure. Sie besitzen eine stark saure, titrierbare Carboxylgruppe und geben, da die Aminogruppe der Neuraminsäure acyliert ist, mit Ninhydrin keine Färbung. Sie reagieren unter den Bedingungen des Resorcin-Testes nach *Svennerholm*⁶ stark positiv; hingegen ist die Farbausbeute im Thiobarbitursäure-Test nach *Aminoff*⁷ nur 3 bis 6% von jener einer äquivalenten Menge N-Glykolyl-D-neuraminsäure.

³ *C. S. Hudson*, J. Amer. chem. Soc. **31**, 66 (1909); Adv. Carbohydr. Chem. **3**, 15 (1948).

⁴ *W. Koenigs* und *E. Knorr*, Ber. dtsch. Chem. Ges. **34**, 957 (1901).

⁵ *E. Klenk* und *G. Uhlenbruck*, Z. physiol. Chem. **307**, 266 (1957).

⁶ *L. Svennerholm*, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **24**, 604 (1957).

⁷ *D. Aminoff*, Biochem. J. **81**, 384 (1961).

Tabelle 1. α -Ketoside der 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-(O-acetyl-glykoly)-D-neuraminsäure

| Glykosidisch gebundener Rest | Summenformel | %C | %H | %N | Glykolsäuregehalt, % d. Th. | Schmp., °C | R _{NG} * | Ausb.** % d. Th. |
|------------------------------|--|------------|------|------|-----------------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| 1 A Methyl | C ₂₂ H ₃₁ O ₁₅ N | Ber. 48,09 | 5,69 | 2,55 | 87 | 183—187 (Zers.) | 2,58 | 27 |
| | | Gef. 47,89 | 5,79 | 2,68 | | | | |
| 2 A n-Amyl | C ₂₆ H ₃₉ O ₁₅ N | Ber. 51,57 | 6,49 | 2,31 | 87 | 183—185 (Zers.) | 2,76 | 47 |
| | | Gef. 51,38 | 6,45 | 2,46 | | | | |
| 3 A n-Decyl | C ₃₁ H ₄₉ O ₁₅ N | Ber. 55,09 | 7,31 | 2,07 | 87 | 169—171 (Zers.) | 2,90 | 18 |
| | | Gef. 55,23 | 7,44 | 2,18 | | | | |
| 4 A Benzyl | C ₂₈ H ₃₅ O ₁₅ N | Ber. 53,76 | 5,64 | 2,24 | 90 | 186—189 (Zers.) | 2,63 | 29 |
| | | Gef. 53,68 | 5,80 | 2,41 | | | | |
| 5 A m-Nitrobenzyl | C ₂₈ H ₃₄ O ₁₇ N ₂ | Ber. 50,15 | 5,06 | 4,17 | 90 | 202—205 (Zers.) | 2,53 | 22 |
| | | Gef. 49,96 | 5,24 | 4,28 | | | | |

* Bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G mit n-Butanol-n-Propanol-0,1*n*-HCl (1:2:1) als Laufmittel bestimmte relative R_F-Werte: R_F Verbindung/ R_F N-Glykoly-D-neuraminsäure.

** Ausbeute bezogen auf Acetochlor-N-glykoly-neuraminsäure, aus der das Ketosid durch Umsetzung mit dem entsprechenden Alkohol in Gegenwart von Ag₂CO₃ dargestellt worden ist.

Tabelle 2. α -Ketoside der N-Glykolyl-D-neuraminsäure

| | Glykosidisch gebundener Rest | Optische Drehung | | R_{NG}^{**} | R_{NG}^{***} | Ausb. % |
|-----|------------------------------|------------------|-------|---------------|----------------|------------------|
| | | $[\alpha]_D$ | c^* | c^C | | |
| 1 B | Methyl | — 9° | 7,5 | 26 | — | 100 ^a |
| 2 B | n-Amyl | — 9° | 7,5 | 26 | 2,44 | 100 ^a |
| 3 B | n-Decyl | — 9° | 7,5 | 22 | 2,65 | 100 ^a |
| 4 B | Benzyl | — 15° | 7,5 | 26 | 2,41 | 100 ^a |
| 5 B | m-Nitrobenzyl | — 9° | 0,33 | 22 | 2,50 | 19 ^b |

* c = Konzentration in H_2O ** Bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G mit n-Butanol—n-Propanol—0,1*n*-HCl (1:2:1) als Laufmittel bestimmte relative R_F -Werte: R_F Verbindung/ R_F N-Glykolyl-D-neuraminsäure.*** Bei der Papierchromatographie mit Äthylacetat—Eisessig—Wasser (3:1:3) als Laufmittel bestimmte relative R_F -Werte: R_F Verbindung/ R_F N-Glykolyl-D-neuraminsäure.

a) Ausb. bezogen auf das acetylierte Derivat, durch dessen Verseifung das Ketosid der N-Glykolyl-D-neuraminsäure dargestellt worden ist.

b) Ausb. bezogen auf Acetochlor-N-glykolyl-D-neuraminsäure, aus der das Ketosid durch Umsetzung mit m-Nitrobenzylalkohol in Gegenwart von Ag_2CO_3 und anschließende Verseifung dargestellt worden ist.

Tabelle 3. Vergleich der spezifischen Drehwerte von Ketosiden der N-Acetyl- und der N-Glykolyl-D-neuraminsäure sowie ihrer Tetra- bzw. Penta-O-acetyl-derivate

| Sialinsäure | α -ketosidisch gebundener Rest: | | | | | $[\alpha]_D$ c (in H_2O) $t, ^\circ C$ |
|--|--|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---|
| | Methyl- | n-Amyl- | n-Decyl- | Benzyl- | Nitrobenzyl- | |
| N-Acetyl-D-neuraminsäure | — 13° 10,9 25 | — 11° 19,5 26 | — 10° 6,6 23 | — 8° 8,5 27 | — 7° 6,2 22 | |
| N-Glykolyl-D-neuraminsäure | — 9° 7,5 26 | — 9° 7,5 26 | — 9° 7,5 22 | — 15° 7,5 26 | — 9° 0,33 22 | |
| Tetra-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäure | — 30° 4,9 23 | — 22° 5,0 26 | — 17° 5,0 26 | — 14° 5,0 24 | — 16° 5,2 24 | |
| Tetra-O-acetyl-N-(O-acetyl-glykolyl)-D-neuraminsäure | — 30° 4,0 26 | — 22° 5,0 24 | — 17° 4,0 26 | — 14° 5,0 22 | — 15° 4,0 24 | |

Das optische Drehungsvermögen der Ketoside der N-Glykolyl-D-neuraminsäure und ihrer O-Acetyl-Derivate ist mit dem Drehvermögen der entsprechenden N-Acetyl-D-neuraminsäure-Ketoside durchaus vergleichbar. In Tab. 3 sind die spezifischen Drehwerte von α -Ketosiden der N-Glykolyl- und der N-Acetyl-D-neuraminsäure sowie ihrer O-Acetyl-Derivate einander paarweise gegenübergestellt.

Für vorbildliche Mitarbeit danken wir Fräulein *T. Frisch*.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Heitztischmikroskop nach *Kofler* bestimmt.

Die Elementaranalysen führte Herr Dr. *J. Zak*, Univ. Wien, aus; die in dieser Arbeit angegebenen Werte sind jeweils das Mittel aus den Ergebnissen einer Doppelbestimmung.

Die optischen Drehungen wurden mit einem Zeiss-Kreispolarmeter $0,01^\circ$ und einem lichtelektrischen Polarimeter (Perkin-Elmer) in 1 dm-Polarimeterrohren gemessen.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel G nach *Stahl* (Merck) und als Laufmittel n-Butanol—n-Propanol—0,1*n*-HCl (1:2:1, *v/v/v*), für die Papierchromatographie Schleicher & Schüll-Papier 2043 a und als Laufmittel Äthylacetat—Eisessig—Wasser (3:1:3, *v/v/v*, absteigend) verwendet. Um die Neuraminsäure-Derivate sichtbar zu machen, wurden die Dünnschichtchromatogramme mit konz. H₂SO₄—Wasser (1:1, *v/v*) besprüht und erhitzt⁸, die Papierchromatogramme mit Natriummetaperjodat und Benzidin behandelt⁹. Als *R*_{NG} bezeichnen wir die auf den *R*_F-Wert der N-Glykolyl-D-neuraminsäure (= 1,00) bezogenen „relativen“ *R*_F-Werte der Neuraminsäurederivate.

N-Glykolyl-D-neuraminsäure

Aus frischen, von Fett und Bindegewebe befreiten Schweine-Submaxillarisdrüsen isolierten wir nach einer von *Blix*¹⁰ für die Aufarbeitung von Rinder-Submaxillarisdrüsen gegebenen Vorschrift Schweine-Submaxillarisdrüsenmucin in Form eines Trockenpulvers. Etwa 70 g des Pulvers, aus 2,5 kg Drüsen erhalten, wurden in 4 l H₂O unter Zugabe von 7—10 cm³ *n*-NaOH suspendiert und sodann nach einer Methode, welche von *Zilliken* und *O'Brien*¹¹ für die Herstellung von N-Acetyl-D-neuraminsäure aus verschiedenen biologischen Materialien angegeben worden war, weiter behandelt. Die gewonnene N-Glykolyl-D-neuraminsäure war jedoch, wie wir papierchromatographisch feststellen konnten, immer mit N-Acetyl-D-neuraminsäure verunreinigt. Bei der Elution des Sialinsäure-Gemisches von einem Dowex 1-X 8 Ionenaustauscher machten wir die Erfahrung, daß etwa die ersten zehn im *Svennerholm*-Test⁶ positiv reagierenden Fraktionen (je Fraktion 20 cm³ Eluat) bis zu 50% N-Acetyl-D-neuraminsäure enthielten. Die folgenden Fraktionen, die mit Resorcin ebenfalls die für Neuraminsäurederivate charakteristische Färbung gaben, enthielten N-Glykolyl-D-neuraminsäure als Hauptmenge neben nur wenig N-Acetyl-D-neuraminsäure. Die daraus durch Eindampfen bei 40° im Vak. erhaltene rohe Säure wurde aus Wasser—Methanol—Äther¹² umkristallisiert. Die Ausbeute betrug im Durchschnitt 2,5 g. Schmp. 199 bis 205° (Zers.). $[\alpha]_D^{23} = -32^\circ$ (*c* = 5,0; Wasser). Der nach *Klenk* und *Uhlenbruck*⁵ ermittelte Glykolsäuregehalt lag bei 80—85% d. Th.

⁸ *K. Randerath*, Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, 1962.

⁹ Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, *E. Merck A. G.*, Darmstadt, (Reagens Nr. 22).

¹⁰ *G. Blix*, Z. physiol. Chem. **240**, 43 (1936).

¹¹ *F. Zilliken* und *P. J. O'Brien*, Biochem. Preparat. **7**, 1 (1960).

¹² *E. Martensson*, *A. Raal* und *L. Svennerholm*, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **30**, 124 (1958).

2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-(O-acetyl-glykoly)-D-neuraminsäure

1,07 g N-Glykoly-D-neuraminsäure wurden mit 20 cm³ Pyridin (über KOH dest.) und 20 cm³ frisch dest. Acetanhydrid unter Eiskühlung und Rühren versetzt. Man ließ 48—72 Stdn. bei + 4° stehen. Sobald die Acetylierung vollständig war, hatte sich die N-Glykoly-D-neuraminsäure gelöst. Nach beendeter Reaktion wurde das überschüssige Ac₂O mit Eiswasser zersetzt und die Lösung zur Entfernung des Pyridins mit überschüssigem Dowex 50-X 8 Austauscher (H⁺-Form) behandelt. Die Eluate, welche die peracetylierte Verbindung enthielten, wurden gesammelt und lyophilisiert. Man erhielt 1,90 g (97% d. Th.) 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-(O-acetyl-glykoly)-D-neuraminsäure als weißes Schaumharz. Dünnschichtchromatogramm: $R_{NG} = 2,10$; die Substanz war nicht ganz einheitlich. Sie wurde von geringen Mengen zweier Substanzen, von denen eine im Chromatogramm schneller, die andere etwas langsamer wanderte, begleitet.

C₂₃H₃₁O₁₆N · H₂O. Ber. C 46,39, H 5,59, N 2,35.

Gef. C 46,11, H 5,55, N 2,07.

2-Chlor-2-desoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-(O-acetyl-glykoly)-D-neuraminsäure

1,80 g peracetylierte N-Glykoly-D-neuraminsäure wurden in 150 cm³ Eisessig und 50 cm³ Ac₂O gelöst und einige Tage im Kühlschrank stehen gelassen. In diese Lösung wurde sodann unter Eiskühlung trockenes Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet. Hierauf wurden im Vak. bei 40° Lösungsmittel und HCl abgetrieben. Durch Aufnehmen des farblosen öligen Rückstandes in 150 cm³ Eisessig und Gefriertrocknen erhielten wir in quantitativer Ausb. die Chlorverbindung in Form einer weißen amorphen Substanz, die sehr hygroskopisch war und sich allmählich zersetzte.

C₂₁H₂₈O₁₄NCl. Ber. C 45,54, H 5,10, N 2,53, Cl 6,40.

Gef. C 45,35, H 5,32, N 2,17, Cl 2,25.

α-Methyl-Ketosid der 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-(O-acetyl-glykoly)-D-neuraminsäure (I A)

1,96 g Acetochlor-N-glykolyneuraminsäure, 50 cm³ absol. Methanol und 1,50 g Silbercarbonat wurden etwa 17 Stdn. bei Zimmertemp. unter Lichtausschluß geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde durch Hyflo-Supercel und eine mit Dowex 50-X 8 (H⁺-Form) beschickte Chromatographiesäule filtriert. Man wusch mit 100 cm³ Wasser nach. Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt und im Vak. bei 40° eingedampft. Der ölige Rückstand, der bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde und 1,7 g wog, wurde in 8 cm³ absol. Methanol gelöst. Nachdem die trübe Lösung durch ein Faltenfilter filtriert und mit 50 cm³ absol. Äther versetzt worden war, kristallisierten nach portionenweiser Zugabe von insgesamt 140 cm³ Petroläther (*PÄ*, 40—60°) 1,32 g 2-Methyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-(O-acetyl-glykoly)-α-D-neuraminsäure vom Schmp. 171—189° (Zers.). Dieses Kristallinat lösten wir noch zweimal aus Methanol—Äther—*PÄ* um und isolierten endlich 537 mg reine 2-Methyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-(O-acetyl-glykoly)-α-D-neuraminsäure (vgl. Tab. 1).

α-Methyl-Ketosid der N-Glykoly-D-neuraminsäure (I B)

450 mg der Peracetylverbindung (I A) wurden in 8 cm³ Wasser aufgenommen und mit 8 cm³ *n*-NaOH 20 Min. bei 40° verseift. Zur Entfernung der Na⁺-Ionen wurde mit überschüss. Kationenaustauscher Dowex 50-X 8

(H⁺-Form) versetzt, der Austauscher mit Wasser ausgewaschen und das Filtrat lyophilisiert. Man erhielt 275 mg chromatographisch einheitliche 2-Methyl-N-glykoly- α -D-neuraminsäure als farbloses Schaumharz (vgl. Tab. 2).

α -(n-Amyl)-Ketosid der 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-(O-acetyl-glykoly)-D-neuraminsäure (2 A)

1,09 g frisch bereitete Acetochlor-N-glykolyneuraminsäure wurden in 10 cm³ wasserfr. n-Amylalkohol gelöst, mit 1,30 g Silbercarbonat versetzt und 18 Stdn. bei Zimmertemp. unter Lichtausschluß geschüttelt. Nach beendeter Reaktion wurde mit etwas Aceton—Wasser (1:1) verdünnt, durch Hyflo-Supercel filtriert, das klare Filtrat auf eine mit Dowex 1-X 8 (Formiat-Form) beschickte Säule aufgetragen und mit Aceton—Wasser nachgewaschen. Sodann wurde mit einer Aceton—Wassermischung, die 0,4 n an Ameisensäure war, die 2-Amyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-(O-acetyl-glykoly)- α -D-neuraminsäure eluiert. Die Eluatfraktionen, die das peracetylierte Ketosid enthielten, wurden im Vak. bei 40° auf ein kleines Volumen eingedampft, wobei 609 mg auskristallisierten. Aus Aceton—Wasser umkristallisiert, fielen 560 mg reine 2-Amyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-(O-acetyl-glykoly)- α -D-neuraminsäure (vgl. Tab. 1) an.

α -(n-Amyl)-Ketosid der N-Glykoly-D-neuraminsäure (2 B)

300 mg 2 A wurden in 4,5 cm³ Wasser aufgenommen, sodann mit 4,5 cm³ n-NaOH tropfenweise versetzt und zur Verseifung der O-Acetylgruppen 20 Min. bei 40° stehen gelassen. Aufgearbeitet wurde wie unter 1 B beschrieben. Die Ausbeute an chromatographisch einheitlicher 2-(n-Amyl)-N-glykoly- α -D-neuraminsäure betrug 200 mg (vgl. Tab. 2).

Auf analoge Art wie 2 A und 2 B wurden die n-Decyl-, Benzyl- und m-Nitrobenzyl- α -Ketoside der 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-(O-acetyl-glykoly)-D-neuraminsäure (3 A bis 5 A, Tab. 1) und durch deren alkalische Verseifung die entsprechenden α -Ketoside der N-Glykoly-D-neuraminsäure (3 B bis 5 B, Tab. 2) dargestellt. 5 B konnte, wie im nächsten Absatz beschrieben wird, auch auf folgendem Wege in kristallisierter Form erhalten werden.

α -(m-Nitrobenzyl)-ketosid der N-Glykoly-D-neuraminsäure (5 B)

2,76 g Acetochlor-N-glykoly-D-neuraminsäure, 2,50 g Silbercarbonat und 21 ml wasserfr. m-Nitrobenzylalkohol wurden unter Lichtausschluß 20 Stdn. bei 30° geschüttelt. Nach beendeter Reaktion wurde das Gemisch mit 60 ml Aceton verdünnt und durch eine Schicht von Hyflo-Supercel filtriert. Das klare Filtrat wurde sodann mit 45 ml Wasser versetzt und diese Lösung auf eine mit Dowex 1-X 8 in der Formiat-Form beschickte Chromatographiesäule aufgebracht. Zuerst wurde mit etwa 1000 ml Aceton—Wasser (1:1) nachgewaschen und anschließend das peracetylierte Nitrobenzylketosid der N-Glykoly-D-neuraminsäure mit 0,4 n-Ameisensäure in Aceton—Wasser (1:1) von dem Austauscherharz eluiert. Die im Resorcin-Test nach Svennerholm⁶ positiv reagierenden Eluat-Fraktionen wurden vereinigt und bei 40° im Vak. eingedampft. Es blieben 3,27 g eines braungefärbten, teilweise kristallinen Harzes zurück. Dieses wurde zur Verseifung der O-Acetylgruppen in 10 ml Wasser gelöst, mit 35 ml n-NaOH versetzt und 10 Min. bei 40° belassen. Von einer amorphen flockigen Fällung wurde abfiltriert und das klare Filtrat zur Entfernung der Na⁺-Ionen mit Dowex 50-X 8 (H⁺-Form) behandelt. Die stark sauer reagierende Lösung wurde nun an deaktiviertem

Al_2O_3 (110 g Aluminiumoxid Woelm, neutral) chromatographiert¹. Das wäßrige, neutral reagierende Eluat wurde in Fraktionen zu je 10 ml auffangen und in regelmäßigen Abständen sowohl dem Resorcin-Test⁶ als auch der Dünnschichtchromatographie unterworfen. Wir vereinigten auf Grund des chromatographischen Vergleiches die Fraktionen 4—60. Es wurde auf ein kleines Volumen eingengt, durch 30 ml Dowex 50-X8 (H^+ -Form) filtriert und die nun wieder stark sauer reagierende Lösung im Vak. bei 40° eingengt. Wir erhielten nach dem Trocknen 863 mg eines Harzes, das wie folgt zur Kristallisation gebracht werden konnte: Es wurde in 1,2 ml Wasser und 11 ml Methanol gelöst und mit 130 ml Äther versetzt. Die anfänglich klare Lösung wurde bei der Ätherzugabe opalisierend und alsbald begann das Ketosid zu kristallisieren. Wir isolierten insgesamt 631 mg rohe 2-(*m*-Nitrobenzyl)-*N*-glykoly- α -*D*-neuraminsäure, Schmp. 155—162° (Zers.). Das Kristallisat wurde zur Reinigung aus Wasser—Methanol—Äther umgelöst. Die Ausb. an reinem α -Ketosid betrug 448 mg (19,4% d. Th.), Schmp. 165° (Zers.). R_{NG} -Werte sowie spezif. Drehung s. Tab. 2.

$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_{12}\text{N}_2$. Ber. C 46,96, H 5,25, N 6,09.

Gef. C 46,68, H 5,48, N 6,18.

Dem Thiobarbitursäuretest⁷ unterworfen, ergab die 2-(*m*-Nitrobenzyl)-*N*-glykoly- α -*D*-neuraminsäure nur 3% der für eine äquivalente Menge *N*-Glykoly-*D*-neuraminsäure erwarteten Farbausbeute. Durch *Vibrio cholerae*-Neuraminidase wird sie quantitativ gespalten.